

## Analisis Ekspresi CD133 dan CXCR4 dengan Kejadian Metastasis pada Osteosarkoma

Nunik Hapsari Susilowati, Sjahjenny Mustokoweni

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga Surabaya

### ABSTRAK

#### Latar belakang

Osteosarkoma memiliki prognosis buruk oleh karena kejadian metastasis yang tinggi dan kemoresisten. *Cancer stem cell* dapat diidentifikasi menggunakan penanda tumor CD133. *Cancer stem cell* osteosarkoma mempunyai potensi pertumbuhan yang tinggi dan berperan terhadap kejadian metastasis pada paru. Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa CXCR4, reseptor kemokin dari keluarga gen GPCR, telah terbukti berperan penting dalam metastasis *cancer stem cell*. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis hubungan antara ekspresi CD133 dan CXCR4 pada osteosarkoma dengan kejadian metastasis, serta hubungan ekspresi CD133 dan CXCR4 pada osteosarkoma.

#### Metode

Pada penelitian ini dilakukan observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Sampel penelitian adalah blok parafin dari penderita osteosarkoma yang diagnosa secara histopatologi di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo selama tahun 2007-2013 terdiri atas 24 blok parafin, 9 diantaranya dengan kejadian metastasis. Data metastasis diperoleh dari rekam medik. Pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan *rabbit polyclonal antibody* CD133 dan CXCR4 *rabbit polyclonal antibody*. Derajat ekspresi CD133 dan CXCR4 dinilai berdasarkan jumlah sel tumor yang menunjukkan imunoreaktivitas secara semikuantitatif. Ekspresi CD133 dan CXCR4 pada kejadian metastasis pada osteosarkoma dianalisis dengan uji *chi-square* dan uji korelasi Spearman dengan tingkat kemaknaan  $p < 0,05$ .

#### Hasil

Didapatkan 9 dari 24 kasus osteosarkoma dengan metastasis 7 dari 9 (77,8%) menunjukkan ekspresi CD133 dan CXCR4 positif dengan intensitas sedang sampai kuat. Terdapat hubungan antara ekspresi CD133 dan CXCR4 dengan kejadian metastasis ( $p=0,035$ ) dan terdapat hubungan positif antara ekspresi CD133 dan CXCR4 dengan  $r=0,0864$  ( $p=0,000$ ).

#### Kesimpulan

Ekspresi CD133 dan CXCR4 meningkat sesuai dengan kejadian metastasis pada osteosarkoma. Ekspresi CD133 dan CXCR4 memiliki hubungan berbanding lurus.

**Kata kunci :** CD133, CXCR4, metastasis, osteosarkoma.

### ABSTRACT

#### Background

Osteosarcoma is associated with poor prognosis due to its high incidence of metastasis and chemoresistance. Cancer stem cell can be identified by using tumor marker CD133. Cancer stem cell in osteosarcoma has high growth potential and contributes to the incidence of metastases. Several studies showed that CXCR4. A chemokine receptor in GPCR gene family, has been proven to play an essential role in the metastasis of cancer stem cell. To analyze the correlation of CD133 and CXCR4 expression with incidence of metastasis in osteosarcoma.

#### Methods

This is an analytical observational cross sectional research. The samples were paraffin blocks diagnosed histopathologically as osteosarcoma in Anatomic Pathology Laboratory Dr. Soetomo Hospital during 2007-2013, consisted of 24 paraffin blocks, 9 of them with the incidence of metastasis. Incidence of metastasis was collected from medical record. Immunohistochemical examination using rabbit polyclonal antibody CD133 rabbit polyclonal antibody CXCR4. Expression of CD133 and CXCR4 were assessed based on the number of tumor cells that showed immunoreactivity semiquantitatively. CD133 and CXCR4 expression with metastasis in osteosarcoma incidence was analyzed with chi-square test, and Spearman correlation test with significance on  $p < 0.05$ .

#### Results

There were 9 of 24 cases osteosarcoma with metastasis. 7 of 9 (77.8%) showed moderate until strong expression of CD133 and CXCR4. There was correlation between CD133 and CXCR4 expression with the occurrence of metastases ( $p=0.035$ ), and there was a positive correlation between the expression of CD133 and CXCR4 ( $p=0.000$ ).

#### Conclusion

Expression of CD133 and CXCR4 increased in accordance with the incidence of metastasis in osteosarcoma. Expression of CD133 and CXCR4 have positive correlation.

**Key words:** CD 133, CXCR4, metastasis, osteosarcoma.

**PENDAHULUAN**

Osteosarkoma (OS) sebagai tumor tulang ganas primer, biasanya terjadi pada anak-anak, remaja dan dewasa muda,<sup>1,2</sup> dengan angka kejadian berdasarkan umur adalah sekitar 5 per satu juta per tahun.<sup>2,3</sup> Data Rekam Medik RSUD Dr. Soetomo menunjukkan dalam kurun waktu antara tahun 2000-2005 atau selama 6 tahun terdapat 122 kasus osteosarkoma atau sebesar 32,19% dari keseluruhan tumor tulang. Selanjutnya data tahun 2006-2009 menunjukkan peningkatan signifikan hampir tiga kali lipat karena dalam rentang waktu 4 tahun didapatkan 354 penderita osteosarkoma berbagai jenis atau rata-rata terdapat 88 penderita baru per tahun yang lebih dari 90% datang dalam keadaan lanjut (Rekam Medik RSUD Dr. Soetomo, 2009). Proses penyebaran terjadi secara hematogen. Meskipun saat ini sudah meningkat pengobatan multidisiplin, termasuk reseksi agresif bedah dan kemoterapi multiagen intensif dan radioterapi,<sup>2,4</sup> 30% pasien osteosarkoma masih mengalami kekambuhan lokal, dan 80% dengan metastasis saat diagnosis mengalami kekambuhan,<sup>2,5</sup> dan 40% dari pasien meninggal dengan metastasis paru.<sup>2,6,7</sup> Oleh karena itu mengidentifikasi faktor yang berperan terhadap prognosis membantu pasien osteosarkoma dalam pemilihan manajemen yang lebih agresif pada waktu awal.<sup>2,8,9</sup>

*Cancer stem cell* dianggap bagian dari tumor yang bertanggung jawab untuk memulai dan mempertahankan penyakit. CSC secara alami resisten terhadap kemoterapi. Beberapa marker permukaan seluler telah digunakan untuk mengidentifikasi CSC, diantaranya adalah CD133. *Cancer stem cell* pada osteosarkoma mempunyai potensi pertumbuhan yang tinggi dan berperan terhadap kejadian metastasis pada paru. Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa CXCR4, reseptor kemokin dari keluarga gen GPCR, telah terbukti memainkan peran penting dalam metastasis *cancer stem cell*. *Osteosarcoma stem cell* ditemukan lebih mengekspresikan CXCR4 dari sel tumor yang normal.<sup>10,11</sup>

Berdasarkan uraian di atas, perlu untuk dilakukan penelitian mengenai ekspresi CD133 dan CXCR4 pada osteosarkoma dalam hubungannya dengan kejadian metastasis sehingga dapat digunakan untuk menentukan faktor prognosis dan penatalaksanaan osteosarkoma. Sampai saat ini, penelitian tersebut belum pernah dilakukan di sentra Patologi Anatomi

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

**METODE PENELITIAN**

Rancangan penelitian yang digunakan merupakan observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Sampel penelitian adalah 24 kasus osteosarkoma terdiri atas 9 kasus osteosarkoma dengan kejadian metastasis dan 15 kasus osteosarkoma tanpa metastasis yang telah dioperasi dan dilakukan pemeriksaan histopatologi di Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya periode 2007-2013.

Ekspresi protein CD133 adalah ekspresi protein CD133 yang diperiksa secara imunohistokimia dengan antibodi *polyclonal rabbit* terhadap protein CD133 Bioss, dihitung secara visual dengan mikroskop cahaya binokuler pembesaran 400x. Ekspresi protein CXCR4 adalah ekspresi protein CXCR4 yang diperiksa secara imunohistokimia dengan antibodi *polyclonal rabbit* terhadap protein CXCR4 Boster, dihitung secara visual dengan mikroskop cahaya binokuler pembesaran 400x. Dikatakan positif jika skor 2 atau 3 dengan intensitas sedang sampai kuat.

Data yang dikumpulkan dianalisis dengan *statistical package for the social sciences* (SPSS). Untuk menganalisa hubungan ekspresi CD133 terhadap kejadian metastasis pada osteosarkoma menggunakan uji *chi-square* ( $p < 0,05$ ). Analisa hubungan ekspresi CXCR4 terhadap kejadian metastasis pada osteosarkoma dengan menggunakan uji statistik *chi-square* ( $p < 0,05$ ). Sedangkan hubungan antara ekspresi CD133 dengan ekspresi CXCR4 pada osteosarkoma dengan uji Spearman ( $p < 0,001$ ).

**HASIL**

Pada Tabel 1 ditunjukkan bahwa pasien osteosarkoma terutama berjenis kelamin laki-laki (79,2%) dan perempuan (20,8%) dengan rasio 3,8 : 1.

Pasien osteosarkoma berusia antara 12 tahun sampai 64 tahun. Usia penderita osteosarkoma paling banyak berada pada rentang 15-29 tahun (62,5%).

Lokasi osteosarkoma terbanyak pada regio *cruris* (54%) kasus, sedangkan tipe histopatologi terbanyak adalah tipe kondroblastik (37,4%) dan lokasi metastasis terbanyak pada paru-paru (88,9%).

Tabel 1. Karakteristik penderita osteosarkoma sampel penelitian.

Karakteristik	Kategori	Frekuensi (%)
Jenis kelamin	Laki-laki	19 (79,2%)
	Perempuan	5 (20,8%)
Usia (tahun)	<15	2 (8,3%)
	15-29	15 (62,5%)
	30-44	5 (20,9%)
	≥ 45	2 (8,3%)
Lokasi osteo-sarkoma	<i>Cruris</i>	13 (54%)
	<i>Femur</i>	5 (21%)
	<i>Humerus</i>	1 (4%)
	<i>Mandibula</i>	3 (13%)
	<i>Skull base</i>	1 (4%)
	<i>Pelvis</i>	1 (4%)
Tipe osteosarkoma	<i>Conventional</i> kondroblastik	9 (37,4%)
	Fibroblastik	1 (4%)
	Osteoblastik	3 (13%)
	<i>Giant cell rich</i>	4 (16,6%)
	<i>Telangiectatic</i>	1 (4%)
	Tanpa keterangan	6 (25%)
		6 (25%)
Metastasis	Tidak	15 (62,5%)
	Ya	9 (37,5%)
	Paru-paru	8 (88,9%)
	Tulang	1 (11,1%)

Tabel 2. Ekspresi CD133 pada osteosarkoma

Ekspresi CD 133	Frekuensi pada metastasis (%)	Frekuensi pada non metastasis (%)
Positif	7 (77,7%)	5 (33,3%)
Negatif	2 (22,3%)	10 (66,7%)

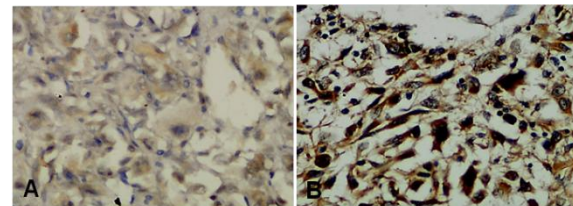
Tabel 3. Ekspresi CXCR4 pada osteosarkoma.

Ekspresi CXCR4	Frekuensi pada metastasis (%)	Frekuensi pada non metastasis (%)
Positif	7 (77,7%)	5 (33,3%)
Negatif	2 (22,3%)	10 (66,7%)

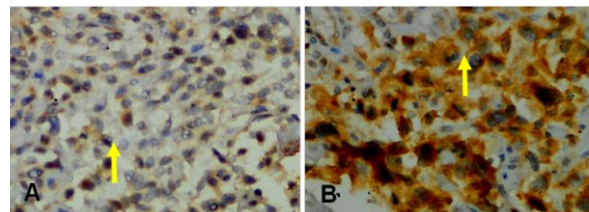
Osteosarkoma dengan kejadian metastasis didapatkan 77,7% kasus terpulas positif dengan intensitas sedang sampai kuat. Sedangkan osteosarkoma tanpa kejadian metastasis didapatkan 33,3% kasus terpulas positif dengan intensitas sedang sampai kuat. Uji *chi-square* antara ekspresi CD133 dan CXCR4 dengan kejadian metastasis osteosarkoma menunjukkan hubungan bermakna didapatkan hasil masing-masing  $p=0,035$ . Dan terdapat hubungan ekspresi CXCR4 terhadap kejadian metastasis pada osteosarkoma.

Berdasarkan Tabel 2 diperoleh data osteosarkoma dengan kejadian metastasis didapatkan 7 (77,7%) dari 9 kasus, terpulas positif CD133 dengan intensitas sedang sampai kuat. Sedangkan osteosarkoma tanpa kejadian metastasis didapatkan 5 (33,3%) dari 15 kasus, terpulas positif CD133 dengan intensitas sedang sampai kuat (Gambar 1).

Berdasarkan Tabel 3 diperoleh data osteosarkoma dengan kejadian metastasis didapatkan 7 (77,7%) dari 9 kasus, terpulas positif CXCR4 dengan intensitas sedang sampai kuat. Sedangkan osteosarkoma tanpa kejadian metastasis didapatkan 5 (33,3%) dari 15 kasus, terpulas positif CXCR4 dengan intensitas sedang sampai kuat (Gambar 2).



Gambar 1. Ekspresi CD133 positif pada osteosarkoma. A. Terpulas dengan skor 2 dengan intensitas sedang; B. Terpulas dengan skor 3 dengan intensitas kuat (400x).



Gambar 2. Ekspresi CXCR4 pada osteosarkoma. A. Terpulas dengan skor 2 dengan intensitas sedang; B. Terpulas dengan skor 3 dengan intensitas kuat (400x).

**DISKUSI**

Insiden osteosarkoma sebagian besar terjadi pada dekade kedua, serta angka kejadian pada laki-laki lebih tinggi dibandingkan pada perempuan dengan perbandingan rasio yang berbeda-beda. Osteosarkoma dapat ditemukan pada semua lokasi tulang, namun paling banyak ditemukan pada tulang panjang ekstremitas, terutama distal femur, proximal tibia dan proksimal humerus dengan persentase didapatkan pada regio genu sebesar 50%. Varian histologik yang sering didiagnosa secara histopatologik adalah osteosarkoma tipe konvensional (osteoblastik, kondroblastik dan fibroblastik). Lokasi metastasis tersering untuk metastasis osteosarkoma adalah paru-paru dan terbanyak kedua adalah tulang.

Pada Tabel 2 menunjukkan 7 dari 9 kasus osteosarkoma dengan metastasis terpulas positif CD133, dan pada analisa statistik

didapatkan hubungan yang bermakna antara ekspresi CD133 terhadap kejadian metastasis. ( $p=0,035$ ). Hasil tersebut didukung penelitian terdahulu yang mendapatkan korelasi yang signifikan antara ekspresi CD133 dan kejadian metastasis pada osteosarkoma.<sup>1</sup>

Penelitian lain pada kanker pankreas menyimpulkan bahwa terdapat korelasi antara ekspresi CD133 dengan kejadian metastasis, VEGF dan prognosis.<sup>8</sup> Penelitian lain pada adenokarsinoma gaster menunjukkan adanya korelasi antara ekspresi CD133 dengan tumor yang lebih besar, TNM stage, metastasis limfatik dan kelangsungan hidup.<sup>9</sup>

Pada Tabel 3 menunjukkan 7 dari 9 kasus osteosarkoma dengan metastasis terdapat positif CXCR4 dan pada analisa statistik didapatkan hubungan yang bermakna antara ekspresi CXCR4 dengan terhadap kejadian metastasis ( $p=0,035$ ). Penelitian terdahulu menunjukkan CXCR4 memainkan peran kunci dalam homing metastasis sel tumor ke organ yang kaya ligan CXCL12. VEGF dan atau aktivasi *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) juga memiliki kemampuan untuk meningkatkan ekspresi CXCR4 khususnya selama perkembangan kanker. Gen ini meningkatkan ekspresi CXCR4 mendorong invasi dan metastasis.<sup>10</sup>

CXCR4 berperan memperlancar metastasis, ketika sel tumor memasuki darah atau sistem limfatik, sel tumor secara istimewa akan bermigrasi dan memasuki daerah yang tinggi ekspresi CXCL12. Kanker payudara mengikuti pola metastasis ini, sel tumor bermigrasi ke kelenjar getah bening, paru-paru, hati, dan sumsum tulang, yang semuanya memiliki ekspresi yang tinggi CXCL12.<sup>10</sup>

CD133 telah dianggap sebagai penanda *cancer stem cell* dalam beberapa jenis tumor. Penelitian terdahulu menguji ekspresi mRNA dari gen *stemness* Oct-4, NANOG dan reseptor terkait metastasis CXCR4 menggunakan RT-PCR pada populasi sel CD133+ dan sel CD133-. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi mRNA secara signifikan lebih tinggi pada populasi CD133+.<sup>1</sup> Penelitian lain pada kanker kolon juga menunjukkan adanya koekspresi CD 133 dan CXCR4 pada kanker kolon berkaitan dengan staging dan metastasis kelenjar getah bening. Hal tersebut serupa dengan penelitian ini di mana terdapat hubungan antara ekspresi CD133 dan CXCR4 pada OS dengan

uji lanjutan Spearman didapatkan hasil koefisien korelasi  $r=0,864$  dan  $p=0,000$ .<sup>11</sup>

### KESIMPULAN

Ekspresi CD133 dan CXCR4 meningkat sesuai dengan kejadian metastasis dan didapatkan hubungan antara ekspresi CD133 dengan ekspresi CXCR4 pada osteosarkoma yang berbanding lurus.

### DAFTAR PUSTAKA

1. He A, Huang YJ, Taofeng, Chen J, Sun YJ, 2012. CD133 expression predict lung metastasis and poor prognosis in osteosarcoma patients: A clinical and experimental study. *Exp Ther Med.* 2012; 4: 435-41.
2. Octavian G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res.* 2009; 152: 3-13.
3. Ozaki T, Flege S, Kevric M, Linder N, Maass R, Delling G, *et al.*, 2003. Osteosarcoma of the pelvis: experience of the cooperative osteosarcoma study group. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 334-41.
4. Lin F, Zheng SE, Shen Z, Tang L, Chen P, Sun Y, *et al.* Relationships between levels of CXCR4 and VEGF and blood-borne metastasis and survival in patients with osteosarcoma. *Med Oncol.* 2010; 28: 649-53.
5. Lee JA, Kim MS, Kim DH, Lim JS, Yoo JY, Koh JS, *et al.* Relative tumor burden predicts metastasis-free survival in pediatric osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2008; 50: 195-200.
6. Broadhead ML, Clark JCM, Myers DE, Dass CR, Choong PFM. The molecular pathogenesis of osteosarcoma: A Review. *Hindawi Pub Co.* 2011: 1-12.
7. Demiralp B, Sarkar G, Okuno SH, Yaszemski MJ, Maran A. Osteosarcoma an evaluation of current diagnosis, treatment and chemotherapy. *Eur Musculo-skel Rev.* 2011; 6: 18-23.
8. Maeda SS, Shinchi H, Kurahar H, Mataka Y, Maemura K, Sato M *et al.*, 2008. CD 133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2008; 98: 1389-97.
9. Yu JW, Zhang P, Wu JG, Wu SH, Li XQ, Wang ST, *et al.* Expressions and clinical significances of CD 133 protein and CD133

- mRNA in primary lesion of gastric adenocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010; 29:1-10.
10. Furusato B, Rhim JS. CXCR4 and Cancer. In: AM Fulton (ed.), *Chemokine Receptors in Cancer, Cancer Drug Discovery and Development.* Humana Press. A part of Springer Science. Business Media. LLC. 2009.
  11. Zhang NH, Li J, Li Y, Zhang XT, Liao WT, Zhang JY, *et al.* Co-expression of CXCR4 and CD133 protein is associated with poor prognosis in stage II-III colon cancer patients. *Exp Ther.* 2012; 3: 973-82.